



(51) 国際特許分類6 A61L 27/00, A61F 2/04	A1	(11) 国際公開番号 WO98/22155 (43) 国際公開日 1998年5月28日(28.05.98)
(21) 国際出願番号 PCT/JP97/04203		(81) 指定国 CA, CN, JP, KR, US, 欧州特許 (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).
(22) 国際出願日 1997年11月19日(19.11.97)		添付公開書類 国際調査報告書
(30) 優先権データ 特願平8/308854 1996年11月20日(20.11.96) JP		
(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 株式会社 タピック (TAPIC INTERNATIONAL CO., LTD.)[JP/JP] 〒105 東京都港区虎ノ門1丁目22番12号 SVAX TSビル Tokyo, (JP) (71) 出願人 ; および (72) 発明者 清水慶彦(SHIMIZU, Yasuhiko)[JP/JP] 〒611 京都府宇治市木幡御蔵山39-676 Kyoto, (JP) (74) 代理人 弁理士 津国 肇(TSUKUNI, Hajime) 〒105 東京都港区虎ノ門1丁目22番12号 SVAX TSビル Tokyo, (JP)		
(54) Title: ARTIFICIAL NEURAL CANAL		
(54)発明の名称 人工神経管		
(57) Abstract An artificial neural canal which remains <i>in vivo</i> until nerve regeneration, does not remain as a foreign substance <i>in vivo</i> after nerve regeneration, induces axon regeneration from nerve stumps, accelerates the penetration of capillaries from the organism, and thus accelerates the regeneration of nerve tissues. The neural canal comprises: tubes (10 and 20) comprising tubes (11 and 21) which are made of a material decomposable and absorbable <i>in vivo</i> and are covered on the inner and outer sides thereof with coating layers (12, 13, 22, and 23) made of gelatin or collagen; and collagen parts (30 and 40) disposed in the lumens of the tubes (10 and 20) and each having a space extending through the tube almost in parallel with the axis of the tube. Each space is filled with a matrix gel. A process for producing the artificial neural canal is also provided.		

本発明は、神経が再生するまでは生体内で残存し、神経の再生後は、異物として生体に残存することがなく、切断された神経断端からの軸索の再生を誘導し、生体からの毛細血管の侵入を促し、神経組織の再生を促す人工神経管を提供するものであり、その構成は、生体内分解吸収性材料からなるチューブ11、21の内面及び外面にゼラチン又はコラーゲンからなる被覆層12、13、22、23を有するチューブ10、20と、その内腔に、該チューブの軸線にはほぼ平行に該チューブを貫通する空隙を有するコラーゲン体30、40からなり、更に該空隙が、マトリックスゲルで充填されている人工神経管、及びその製造方法である。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AL	アルバニア	FI	フィンランド	LT	リトアニア	SN	セネガル
AM	アルメニア	FR	フランス	LU	ルクセンブルグ	SZ	スワジランド
AT	オーストリア	GA	ガボン	LV	ラトヴィア	TD	チヤード
AU	オーストラリア	GB	英国	MC	モナコ	TG	トーゴー
AZ	アゼルバイジャン	GE	グルジア	MD	モルドバ	TJ	タジキスタン
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	GH	ガーナ	MG	マダガスカル	TM	トルコメニスタン
BB	バルバドス	GM	ガンビア	MK	マケドニア旧ユーゴス	TR	トリニダッド・トバゴ
BE	ベルギー	GN	ギニア	ML	マリ	UA	ウクライナ
BF	ブルキナ・ファソ	GW	ギニア・ビサオ	MN	モンゴル	UG	ウガンダ
BG	ブルガリア	GR	ギリシャ	MR	モーリタニア	US	米国
BI	ベナン	HU	ハンガリー	MW	マラウイ	UZ	ウズベキスタン
BR	ブラジル	ID	インドネシア	MX	メキシコ	VN	ヴィエトナム
BY	ベラルーシ	IE	アイルランド	NE	ニジェール	YU	ユーゴースラヴィア
CA	カナダ	IL	イスラエル	NL	オランダ	ZW	ジンバブエ
CF	中央アフリカ	IT	イスランド	NO	ノルウェー		
CG	コシゴー共和国	JP	日本	NZ	ニュージーランド		
CH	スイス	KE	ケニア	PL	ポーランド		
CI	コートジボアール	KG	キルギス	PT	ポルトガル		
CM	カメルーン	KP	北朝鮮	RO	ルーマニア		
CN	中国	KR	韓国	RU	ロシア		
CU	キューバ	KZ	カザフスタン	SD	スードーン		
CY	キプロス	LC	セント・ルシア	SG	スウェーデン		
CZ	チェコ	LI	リヒテンシュタイン	SI	シンガポール		
DE	ドイツ	LK	スリランカ	SK	シロヴェニア		
DK	デンマーク	LR	リベリア	SL	スロ伐キア		
EE	エストニア	LS	リトアニア				
ES	スペイン						

明細書

人工神経管

5 技術分野

本発明は、人工神経管に関する。

背景技術

末梢神経が、手術で切断されたり、あるいは外傷により切断された場合、切断された末梢神経の断端の相互を直接吻合する方法がまず試みられる。しかし、多くの場合、切断された神経を正確に直接吻合することは不可能であり、切断されたまま放置されることがある。このため、末梢側に向かって再生しようとする神経が、結合組織などに阻まれ、末梢側神経断端に到達できずに、切断端神経腫となって再生が停止し、その結果、術創や創傷の治癒後、切断された神経の機能が回復せず、後遺症が残ることが多い。直接吻合が不可能である場合、同じ患者から、その機能のあまり重要でない末梢神経を部分的に切除し、これを用いて神経の切断箇所に自家移植を行うこともある。しかし、この方法でも、神経機能が十分に回復されないことが多いばかりでなく、移植神経を採取した部分においても機能の低下が見られることが多い。

そこで、切断された末梢神経の断端の相互を、チューブ状の医用材料、つまり人工神経管で接続し、神経幹の中枢側断端から末梢側断端に向かって軸索が再生し、正しい方向に伸びるのを誘導して、

末梢神経幹から神経筋接合部又は末梢感覚受容器まで到達させ、これにより、機能を回復させようとする試みが多数行われてきた。人工神経管としては、従来、シリコーン、ポリエチレン、ポリ塩化ビニルなどからなる非多孔性チューブ、延伸ポリテトラフルオロエチレン、セルロースなどからなる多孔性チューブ、ポリアクリロニトリルやポリスルホンなどからなる半透膜チューブ、生体内分解性材料であるポリグリコール酸、ポリ乳酸もしくはこれらの共重合体などからなるチューブ、あるいはゼラチンチューブ、あるいは動脈もしくは静脈などの同種由来の生体組織チューブが試みられてきた。

しかし、これらの材料による末梢神経の再生実験では、材料により生体の修復が妨げられるため、これまで再生することのできた神経の長さは、長くても 15 mm 程度のものである。また、再生する神経が細く、神経の形態が正常に回復しないばかりか、再生した神経の機能も回復しないことが多い。また、神経成長因子である NGF をチューブに充填した例も報告されているが、NGF が早期に流出、拡散してしまうため、優れた効果は得られていない。

最近では、コラーゲンチューブに、ラミニン及びフィプロネクチンを被覆したコラーゲン線維を充填した人工神経管 (Tong, X., et al. Brain Research 663: 155-162 (1994)) が試みられているが、神経がより長く再生するまでの間、コラーゲンチューブが分解されずに残存することができず、良好な結果は得られていない。

一方、脊髄は、一度損傷を受けると再生しないと考えられてきた。外傷、腫瘍などにより脊髄が損傷を受けた場合、損傷を受けた脊髄は再生することなく、損傷部以下の機能は失われたままであり、対

麻痺が後遺症として残ることになる。しかし、最近は、脊髄も再生しうることを証明する動物実験が行われ始め、脊髄を鋭利に切断し、正確に再縫合した場合は、機能が回復し、脊髄損傷部もかなり修復されること、脊髄の一部を管状に切除し、この箇所に肋間神経束を埋植すると、脊髄の一部が再生し、機能も部分的ではあるが回復すること、そして脊髄の一部を管状に切除し、この箇所に胎児の脊髄を移植すると、脊髄の機能も形態も回復することなどが、ラットの実験で観察されている。この場合でも、移植する胎児の脊髄片を、それぞれの神経突起を正しく対応させて移植した場合にのみ再生が起きることが認められている。以上の知見より、脊髄においても、正確に再生組織のコンパートメントを一致させる様に誘導することによって、脊髄の再生が起こり得ることが判明したが、実際に脊髄の再生を可能とする人工脊髄管は全く開発されていない。

そこで、神経が再生するまで生体内で残存させることができるよう、生体内分解速度をコントロールでき、神経の再生と共に生体内で分解吸収されるため、神経の再生後、再生した神経を圧迫するところがなく、切断された神経断端から再生してくる軸索が正しい方向に伸びるように誘導し、生体からの毛細血管の侵入を促すによって早期の血流回復をもたらし、神経組織の再生を促すような人工神経管の開発が望まれてきた。また末梢神経ばかりでなく、脊髄の欠損部分を接続し、脊髄組織を正しく再生し、機能回復を促す人工脊髄管の開発も熱望されている。

発明の開示

本発明は、生体内分解吸収性材料からなるチューブ 11、21 の
内面及び外面にゼラチン又はコラーゲンからなる被覆層 12、13、22、23 を有するチューブ 10、20 と、その内腔に、該チューブの軸線にほぼ平行に該チューブを貫通する空隙 32、33、41 を有するコラーゲン体 30、40 からなり、更に該空隙が、コラーゲン、ラミニン、ヘパラン硫酸プロテオグリカン、エンタクティン及び成長因子を含むマトリックスゲルで充填されている人工神経管に関する。本発明はまた、上記人工神経管を製造する方法であって、生体内分解吸収性材料からなるチューブ 11、21 の内面及び外面にゼラチン又はコラーゲンからなる被覆層 12、13、22、23 を有するチューブ 10、20 を作成し；該チューブの軸線にほぼ平行にコラーゲン線維束を挿入し；架橋処理に付し；そして該チューブ内の該コラーゲン線維 31 間の空隙 32 及び該コラーゲン線維と該チューブとの間の空隙 33 に、コラーゲン、ラミニン、ヘパラン硫酸プロテオグリカン、エンタクティン及び成長因子を含むマトリックスゲルを充填する方法、ならびに生体内分解吸収性材料からなるチューブ 11、21 の内面及び外面にゼラチン又はコラーゲンからなる被覆層 12、13、22、23 を有するチューブ 10、20 を作成し；該チューブの軸線にほぼ平行に棒状の芯材を挿入し；該チューブにコラーゲン溶液を充填し；架橋処理に付し；芯材を除去して、該チューブを貫通する孔である空隙 41 を形成させたコラーゲンゲルをその内腔に有するチューブを得；そして該空隙にコラーゲン、ラミニン、ヘパラン硫酸プロテオグリカン、エンタクティン及び成長因子を含むマトリックスゲルを

充填する方法に関する。

本発明の人工神経管は、生体内分解吸収性材料からなるチューブ 11、21 の内面及び外面にゼラチン又はコラーゲンからなる被覆層 12、13、22、23 を有するチューブ 10、20 と、その内腔に、該チューブの軸線にはほぼ平行に該チューブを貫通する空隙 32、33、41 を有するコラーゲン体 30、40 からなり、更に該空隙が、コラーゲン、ラミニン、ヘパラン硫酸プロテオグリカン、エンタクティン及び成長因子を含むマトリックスゲルで充填されている人工神経管である。本発明の人工神経管を構成するチューブの長さ及び内径は、神経の切断部分の長さ及び神経の太さに応じて異なるが、例えば、ネコを用いて、その座骨神経の約 25mm 程度の欠損部をカバーするには、長さは、約 28～35mm、好ましくは約 30mm、内径は、約 1～8mm、好ましくは約 4mm である。また、本発明の人工神経管を人工脊髄管として使用する場合も、チューブの長さは、切断部分の長さに応じて決定され、その内径は、好ましくは約 2～12mm、特に約 10mm である。

本発明の人工神経管を構成する生体内分解吸収性材料からなるチューブは、切断された神経が再生して、切断された箇所が再結合するまでの間（約 1～3 か月間）、チューブ外からの生体細胞の侵入を防ぐためにチューブの形状を保持する必要があり、そのためには、生体内分解吸収性でありながらも、ある程度の期間、生体内でその形状を維持することのできるポリグリコール酸、ポリ乳酸（L、D L）、グリコール酸と乳酸との共重合体、乳酸と ε-カプロラクトンとの共重合体、ポリジオキサン、及びグリコール酸とトリメ

チレンカーボネートとの共重合体から選択される材料からなるメッシュ状材料、なかでもポリグリコール酸からなるメッシュ状材料のチューブが好ましい。また、ポリグリコール酸などの生体内分解吸収性材料からなるメッシュ状材料のチューブのほか、微細線維化コラーゲンからなる材料のチューブも好適に用いることができる。

5

まず、生体内分解吸収性材料が、ポリグリコール酸などの材料からなるメッシュ状材料であるチューブ11の内面及び外面に、ゼラチン又はコラーゲンからなる被覆層12、13を有する、本発明の人工神経管について記載する。ポリグリコール酸からなるメッシュ状材料からなるチューブ11は、上記したような内径及び長さを有するが、約1～3か月間、人工神経管のチューブ状の形状を保持させるため、該チューブの膜厚は、好ましくは約0.1～3mm、特に約0.5～2mmである。膜厚が約3mmを超えると、生体組織の再生の障害となり、膜厚が約0.1mm未満であると、チューブの分離吸収が早過ぎて、神経が再生し終わるまでその形状が維持されない。また本発明の人工神経管を人工脊髄管として使用する場合、その膜厚は、好ましくは約0.2～5mm、特に、約0.5～3mmである。

10

15

20

生体内分解吸収性材料がポリグリコール酸などの材料である場合、疎水性であるチューブ11に水透過性を確保するため、チューブ11はメッシュ状である。このメッシュ状チューブ11のメッシュ孔径は、好ましくは約10～300μm、特に100～200μmである。メッシュ孔径が、約10μm未満であると細胞や組織が増殖できず、約300μmを越えると組織の進入が過剰となる。

ポリグリコール酸などの材料からなるメッシュ状材料からなるチューブ 1 1 の場合、組織の再生を促進させる作用はないので、チューブ 1 1 の内面及び外面に、組織再生促進作用を有する材料であるゼラチン又はコラーゲンからなる被覆層 1 2、1 3 を有するが、
5 特にチューブ 1 1 の内面及び外面に加えて、メッシュ孔内部表面も被覆されているのが好ましい。被覆層 1 2、1 3 の厚さは、コラーゲン被覆層の場合、好ましくは約 0.2 ~ 5 mm、特に約 0.5 ~ 3 mm であり、ゼラチン被覆層の場合、好ましくは約 0.2 ~ 5 mm、特に約 0.5 ~ 3 mm である。このような組織再生促進作用を有する材
10 料としては、水透過性を有し、生体に適用しても異物反応を起こさず、生体親和性及び組織適合性に優れ、組織の再生を促進させる作用を有するコラーゲン又はゼラチンが挙げられる。コラーゲンの原料としては、従来から用いられている各種動物由来のコラーゲンを使用することができ、例えばウシ、ブタ、ウサギ、ヒツジ、カンガルー、鳥などの動物の皮膚、骨、軟骨、腱、臓器などに由来する、酸、アルカリ、酵素などによって可溶化された I 型コラーゲン、又は I 型及び III 型の混合コラーゲンが好ましい。コラーゲンからなる被覆層は、コラーゲン分子が分散しているアモルファス構造の層である。ゼラチンからなる被覆層は、日局精製ゼラチンを原料とすることができる。
15
20

本発明の人工神経管においては、生体内分解吸収性材料からなるチューブ 1 1、2 1 は、上記のポリグリコール酸などの材料からなるメッシュ状材料からなるチューブ 1 1 のほか、組織再生促進作用のあるコラーゲンを原料とした、微細線維化コラーゲンからなる材

料からなるチューブ 2 1 であることもできる。以下に、生体内分解吸収性材料が、微細線維化コラーゲンからなる材料であり、そしてチューブ 2 1 の被覆層 2 2、2 3 がコラーゲンからなるものである、本発明の人工神経管について記載する。

5 生体内分解吸収性材料の原料として用いるコラーゲンとしては、上記したような、従来から用いられている各種動物由来の、酸、アルカリ、酵素などによって可溶化された I 型コラーゲン、又は I 型及び III 型の混合コラーゲンが好適である。この微細線維化コラーゲンからなる材料は、コラーゲン分子からなる微細線維が多重に折り重なった不織布状の物質であり、これを材料とするチューブ 2 1 は、上記したような内径及び長さを有する。その膜厚は、好ましくは約 0.5 ~ 5 mm、特に約 1 ~ 2 mm であり、また本発明の人工神経管を人工脊髄管として用いる場合は、その膜厚は、好ましくは約 0.5 ~ 5 mm、特に約 1 ~ 3 mm である。また、このチューブ 2 1 の内面及び外面に形成されるコラーゲンからなる被覆層 2 2、2 3 は、上記したような従来から用いられている各種動物由来の可溶化された I 型コラーゲン又は I 型及び III 型の混合コラーゲンを原料とし、コラーゲン分子が分散しているアモルファス構造の層であり、その被覆層の厚さは、好ましくは約 0.1 ~ 2 mm、特に約 0.5 ~ 1 mm である。

本発明の人工神経管は、先に詳細に記載した、生体内分解吸収性材料からなるチューブ 1 1、2 1 の内面及び外面にゼラチン又はコラーゲンからなる被覆層 1 2、1 3、2 2、2 3 を有するチューブ 1 0、2 0 と、その内腔に、チューブ 1 0、2 0 の軸線にはほぼ平

行にチューブ 10、20 を貫通する空隙 32、33、41 を有するコラーゲン体 30、40 からなり、更に該空隙が、コラーゲン、ラミニン、ヘパラン硫酸プロテオグリカン、エンタクティン及び成長因子を含むマトリックスゲルで充填されている。この人工神経管を生体に適用すると、チューブ内腔のコラーゲン体が有する空隙の表面を神経線維が再生の足場として利用して、空隙に神経線維が再生、伸展していく。

好みしい実施態様としては、生体内分解吸収性材料からなるチューブ 10、20 が架橋処理されており、その内腔のコラーゲン体 30 が、該チューブの軸線にほぼ平行に挿入された架橋処理されたコラーゲン線維束であり、更に、コラーゲン線維 31 間の空隙 32 及びコラーゲン線維 31 とチューブ 10、20 との間の空隙 33 が上記のマトリックスゲルで充填されているか、あるいはその内腔のコラーゲン体 40 が、該チューブの軸線にほぼ平行にチューブを貫通する孔である空隙 41 を有する架橋処理されたコラーゲンゲルであり、更に該空隙が上記マトリックスゲルで充填されている。

コラーゲン線維束は、従来から用いられている各種動物の皮膚、骨などに由来するコラーゲンを、酸、アルカリ又は酵素により可溶化することによって得られた I 型コラーゲン線維であることが好ましく、その直径は、好みしくは約 10 ~ 30 μm、特に約 20 μm である。本発明の人工神経管を人工脊髄管として使用する場合は、コラーゲン線維 31 の直径は、好みしくは約 10 ~ 30 μm、特に約 20 μm である。チューブ 10、20 の空隙率は、好みしくは

約 70 ~ 98 %、特に 90 ~ 95 % 程度であり、人工脊髄管の場合は、空隙率は、好ましくは約 70 ~ 98 %、特に 90 ~ 95 % である。例えば、内径 4 mm のチューブの場合、直径約 20 μm のコラーゲン線維 31 が、約 2000 本充填されている。また、このコラーゲン線維 31 は、上記したマトリックスゲルで予め被覆されていること（図示せず）が好ましい。

また、チューブの軸線にほぼ平行にチューブを貫通する孔である空隙 41 は、本人工神経管の生体への適用後、再生する神経線維がその中を伸展するのに必要な孔径を有する必要があり、その孔径は、好ましくは約 30 ~ 200 μm、特に約 80 μm である。また、その数は、人工神経管の太さに応じて異なるが、例えば、内径 4 mm のチューブの場合、好ましくは約 5 ~ 20 本、特に約 12 本である。本発明の人工神経管を人工脊髄管として使用する場合には、チューブを貫通する孔 41 の孔径は、約 30 ~ 200 μm、好ましくは約 80 μm であり、その数は、例えば内径 10 mm のチューブの場合、好ましくは約 20 ~ 150 本、特に約 50 本である。また、チューブを貫通する孔である空隙 41 を有する架橋処理されたコラーゲンゲルは、従来から用いられている各種動物の皮膚、骨などに由来するコラーゲンを、酸、アルカリ又は酵素により可溶化することによって得られた I 型コラーゲンを架橋処理に付すことによってゲル化したコラーゲンである。

以下に、本発明の人工神経管の製造方法について記載する。生体内分解吸収性材料が、ポリグリコール酸、ポリ乳酸、グリコール酸と乳酸との共重合体、乳酸と ε-カプロラクトンとの共重合体、ポ

リジオキサノン、及びグリコール酸とトリメチレンカーボネートとの共重合体から選択される材料からなるメッシュ状材料であり、そしてチューブ 1 1 の内面及び外面にゼラチン又はコラーゲンからなる被覆層 1 2 、 1 3 を有する本発明の人工神経管を製造するには、
5 まずポリグリコール酸などを材料として、メッシュ状材料からなるチューブ 1 1 を作成する。どのような方法によって作成してもよいが、例えばポリグリコール酸などの線維（例えば、直径 0.1 mm の線維）を筒状に編んで、上記の膜厚を有するメッシュ状のチューブを得る。調製したメッシュ状材料チューブ 1 1 を、上記のコラーゲン又はゼラチン溶液に浸漬し、乾燥することによって、チューブ 1 1 の外面及び内面、ならびにメッシュ孔内部表面にもコラーゲン又はゼラチン被覆層 1 2 、 1 3 を形成する。チューブ 1 1 をコラーゲン又はゼラチンで被覆するためには、好ましくは約 1 ~ 3 重量%、特に約 1 ~ 2 重量% のコラーゲンを含む、約 1 N の塩酸溶液 (pH
10 約 3)、又は約 2 ~ 3 0 重量%、好ましくは約 1 0 ~ 2 0 重量% のゼラチン水溶液を使用する。また、ポリグリコール酸などからなるメッシュ状材料のチューブ 1 1 の表面に、プラズマ放電、オゾン照射などの処理を行ってから、コラーゲン又はゼラチンで被覆するのが好都合である。
15
10 生体内分解吸収性材料が、微細線維化コラーゲンからなる材料であり、そしてチューブ 2 1 の被覆層 2 2 、 2 3 が、コラーゲンからなるものである本発明の人工神経管を調製するには、例えば、直径
15 約 1 ~ 8 mm、好ましくは約 4 mm のテフロンなどの棒を芯材として用いる。本発明の人工神経管を人工脊髄管として使用する場合は、
20

好みしくは直径約 2 ~ 12 mm、特に約 10 mm の棒を芯材として用いる。これを、好みしくは約 0.5 ~ 3 重量%、特に約 1 ~ 2 重量% のコラーゲンを含む約 1 N 塩酸溶液にこれを浸漬して、該芯材の表面に、厚さが好みしくは約 5 ~ 20 mm、特に約 10 mm のコラーゲン塩酸溶液層を形成し、これを凍結する(例えば、約 0 °C で約 12 時間)。本発明の人工神経管を人工脊髄管として使用する場合は、厚さが好みしくは約 5 ~ 30 mm、特に約 20 mm のコラーゲン塩酸溶液層を形成し、これを凍結する。凍結することによって、塩酸溶液中に分散しているコラーゲン分子の間に微細な氷が形成され、コラーゲン塩酸溶液が層分離を起こし、コラーゲン分子が再配列することによって微細線維化する。次に、これを更に真空中、凍結乾燥(例えば、約 0 °C で約 24 時間)する。凍結乾燥することによって、コラーゲン分子間の微細な氷が気化するとともに、微細線維が多重に折り重なった不織布状コラーゲン層からなるチューブが得られる。

次に、この微細線維化コラーゲン層を形成させた芯材を、ポリエチレンなどの袋に入れ、密閉し、脱気してコラーゲン層を圧縮する。圧縮することによって、密度の高い微細線維化コラーゲン層 21 が得られる。あるいは、脱気せずに押しつぶすことによって圧縮してもよい。圧縮は、圧縮後のコラーゲン層の厚さが好みしくは約 0.5 ~ 5 mm、特に約 1 ~ 2 mm、人工脊髄管として用いる場合には、厚さが好みしくは約 0.5 ~ 5 mm、特に約 1 ~ 3 mm となるように行う。

このように形成し、圧縮した微細線維化コラーゲン層 21 の内外面上に更にコラーゲン膜 22、23 を形成する。これらのコラーゲ

ン膜 22、23を形成することによって、より高い強度を有する人工神経管が得られる。これらのコラーゲン膜 22、23を形成するには、上記の棒から取り外した微細線維化コラーゲン層 21からなるチューブを再び好ましくは約0.5～3重量%、特に約1～2重量%のコラーゲンを含む約1N 塩酸溶液に浸漬して、微細線維化コラーゲン層 21の内外面上に、コラーゲン塩酸溶液層をそれぞれ形成し、これを風乾する。この浸漬と風乾操作を複数回、好ましくは20回程度繰り返し、コラーゲン分子が分散しているアモルファス構造のコラーゲン膜 22、23とする（コラーゲン塩酸溶液層の厚さは、それぞれ全体として、好ましくは約0.2～1.0mm、特に約0.5mmである）。本発明の人工神経管を人工脊髄管として使用する場合は、微細線維化コラーゲン層 21の内外面上に形成されるコラーゲン膜 22、23の厚みは好ましくは約0.2～1.0、特に約0.5mmである。

15 このようにして調製したチューブ 20は、コラーゲン膜のみからなるチューブと比較して高い引き裂き強度を有するために取扱いやしく、神経との縫合が容易である。

上記のように調製した、生体内分解吸収性材料からなるチューブ 11、21の内面及び外面にコラーゲン又はゼラチンからなる被覆層 12、13、22、23を形成したチューブ 10、20の内腔に、チューブの軸線にほぼ平行にチューブを貫通する空隙 32、33、41を有するコラーゲン体 30、40を形成する。このコラーゲン体 30、40が神経線維が再生、伸展する際の足場となり、このコラーゲン体 30、40が有する空隙 32、33、41に

神経線維が再生、伸展する。

具体的には、上記のように調製したチューブ 11、21 に、チューブの軸線にほぼ平行に I 型コラーゲンの線維束を挿入する。コラーゲン線維束を挿入することによって、線維束を構成している各コラーゲン線維 31 間の空隙 32、及びコラーゲン線維 31 とチューブ 10、20との間の空隙 33 に神経細胞を成長させる。ここで用いられている各種動物の皮膚、骨などに由来するコラーゲンを、酸、アルカリ又は酵素により可溶化することによって得られた I 型コラーゲン線維を使用することができる。コラーゲン線維としては、その直径が、好ましくは約 10～30 μm、特に約 20 μm であるものを使用し、上記の空隙率となるようにコラーゲン線維を挿入する。

次に、好ましくは、上記で調製した生体内分解吸収性材料からなるチューブ 10、20 に架橋処理を行う。架橋処理は、本発明の人工神経管に、末梢神経が再生し終わるまでの間、そのチューブ状の形状を保持させて、神経管外からの細胞の侵入を防ぐために有利である。

架橋処理は、再生を要する神経切断部の長さによっても異なるが、生体への適用後、1～3か月間、チューブ状の形状を保持させる程度に行う。架橋方法としては、γ線架橋、紫外線架橋、電子線架橋、熱脱水架橋、グルタルアルデヒド架橋、エポキシ架橋及び水溶性カルボジイミドが挙げられるが、架橋の程度 コントロールしやすく、架橋処理を行っても、生体に影響を及ぼさない熱脱水架橋が好まし

い。架橋処理は、真空下、例えば約105～150℃、好ましくは約120～150℃、特に好ましくは約140℃の温度で、例えば約6～24時間、好ましくは約6～12時間、特に好ましくは約12時間行う。

5 次に、架橋処理を行った生体内分解吸収性材料からなるチューブ10、20内のコラーゲン線維31間の空隙32、及びコラーゲン線維31とチューブ10、20との間の空隙33に、神経線維の成長を促進するような成分を含有するマトリックスゲルを充填して、本発明の人工神経管を得る。マトリックスゲルには、線維の再生を10 促進させる抽出コラーゲン（特にIV型、例えば30%）、ラミニン（例えば、50～60%）、ヘパラン硫酸プロテオグリカン（例えば、2～5%）、エンタクティン（例えば、5～10%）、ならびにEGF（上皮増殖因子）、 β FGF（線維芽細胞増殖因子）、NGF（神経成長因子）、PDGF（血小板由来増殖因子）、IGF-1（インスリン様増殖因子）、TGF- β （トランスフォーミング成長因子）などの成長因子を含有させる。

上記のように、架橋処理前に生体内分解吸収性材料からなるチューブ10、20に挿入するコラーゲン線維束は、神経線維の成長を促進するような成分を含有するマトリックスゲルであらかじめ20 それぞれの線維を被覆しておくことが好ましい。このマトリックスゲルには、上記マトリックスゲルと同様の成分を含有させるのが好ましい。本コラーゲン線維をマトリックスゲルで被覆するには、浸漬、塗布などどのような方法で行ってもよい。

あるいはまた、具体的には、上記のように調製したチュ

ブ 1 0 、 2 0 に、 チューブの軸線にほぼ平行に、 超弾性を有する材
料からなる棒状の芯材を挿入し、 芯材を挿入した状態のチューブを
I 型コラーゲン溶液に含浸し、 又はこれに I 型コラーゲン溶液を注
入し、 架橋処理に付し、 次いで芯材を除去することによって、 チュー
5 プを貫通する孔である空隙 4 1 を形成させたコラーゲンゲルをその
内腔に有するチューブを得る。 本発明の人工神経管を生体に適用後、
このように形成された孔 4 1 の中を、 神経線維が再生、 伸展する。
したがって、 チューブを貫通する孔 4 1 を形成するために使用する
棒状の芯材は、 再生する神経線維が伸展するのに必要な孔径を有す
10 る必要があり、 その孔径は、 好ましくは約 3 0 ∼ 2 0 0 μm 、 特
に 8 0 μm である。 また、 チューブに挿入する芯材の数は、 人工神
経管の太さに応じて異なるが、 例えば内径 4 mm のチューブの場合、
好ましくは約 5 ∼ 2 0 本、 特に約 1 2 本である。 本発明の人工神経
管を人工脊髄管として使用する場合は、 例えば内径 1 0 mm のチュー
15 プの場合、 チューブに挿入する芯材の数は、 好ましくは
約 2 0 ∼ 1 5 0 本、 特に 5 0 本である。 また、 充填する I 型コラー
ゲン溶液は、 従来から用いられている各種動物の皮膚、 骨などに由
來するコラーゲンを、 酸、 アルカリ又は酵素により可溶化すること
によって得られた I 型コラーゲンを約 1 N 塩酸に溶解したもので、
20 好ましくは約 0.5 ∼ 3 重量% 、 特に約 1 重量% の I 型コラーゲン
を含む。

架橋処理は、 上記と同様に、 熱架橋処理とし、 真空下、 例えば
約 1 0 5 ∼ 1 5 0 ℃ 、 好ましくは約 1 2 0 ∼ 1 5 0 ℃ 、 特に好まし
くは約 1 4 0 ℃ の温度で、 例えば約 6 ∼ 2 4 時間、 好ましくは

約 6 ~ 12 時間、特に好ましくは約 12 時間、熱架橋処理を行う。

架橋温度が 150 °C 以上であると、生体内分解吸収性材料の強度が低下し、105 °C 未満では十分な架橋反応が起きない。

更に、上記で形成されたチューブを貫通する孔である空隙 41 に、
5 上記と同様の成分を有するマトリックスゲルを含浸などの常法により、必要であれば吸引することによって充填して、本発明の人工神経管を得る。

上記のように調製した人工神経管は、外傷又は外科手術などによって切断された神経の両方の断端を本人工神経管に内挿し、その部分を結紮することによって、軸索が再生し、正しい方向に伸びるのを誘導して、軸索を、末梢神経幹から神経筋接合部又は末梢感覺受容器まで到達させて、神経機能を回復させるために使用することができる。また、外傷などによって脊髄が損傷された場合においても、損傷箇所の椎骨をはずし、脊髄の損傷箇所を本人工神経管でカバーすることによって、損傷された脊髄を再生させて、その機能を回復させることができると考えられる。
10
15

図面の簡単な説明

第 1 図は、この発明に係る人工神経管の 1 実施態様の断面を示す
20 図であり、第 2 図は、この発明に係る人工神経管の他の実施態様の断面を示す図である（構成を模式的に示したものであり、寸法は実寸ではない）。

発明を実施するための最良の形態

以下に本発明を、実施例及び比較例により詳細に説明するが、これらは本発明を限定するものではない。

実施例 1

ポリグリコール酸（P G A）線維（ ϕ ：0.1 mm）を筒状に編んで、長さ約30 mm、内径約4～5 mm、膜厚約1 mmのポリグリコール酸のメッシュ状チューブ（メッシュ孔径：約100～200 μ m）を作成し、これを、ブタ皮膚由来の1.0重量%酵素可溶化コラーゲンを含む1N 塩酸溶液に浸漬、次いで乾燥することによって、チューブの外面及び内面、ならびにそのメッシュ孔内部表面を、該コラーゲンで被覆した。

IV型コラーゲン1 g、ラミニン2 g、ヘパラン硫酸プロテオグリカン0.2 g、エンタクティン0.4 g、EGF 2 ng、 β -FGF 0.5 ng、NGF 1 ng、PDGF 3 pg、IGF-1 2 ng、及びTGF- β 1 ngを生理食塩水2 mlに溶解することによって、上記の成分を含むマトリックスゲルを調製した。ブタ皮膚由来酵素可溶化コラーゲン線維（ ϕ ：20 μ m）を、本マトリックスゲルに浸漬することによって、それぞれの線維の表面を被覆し、この線維約2000本を、上記で得られた、コラーゲン被覆層を有するチューブに挿入した。更に、真空下、150℃で24時間の熱脱水架橋処理に付した。更に、チューブとコラーゲン線維の間隙に、本マトリックスゲルを充填して、本発明の人工神経管を得た。

ネコ（体重5 kg）の座骨神経25 mmを切除し、両側の神経断端を上記人工神経管に内挿し、10-0ナイロン糸で結紮して、連結した。

術後、1、2、3又は4か月後に、H R P染色によって軸索輸送を、大脳体性感覚誘発電位及び誘発筋電図によって生理学的機能を観察した。ネコを犠牲死させ、肉眼及び光学顕微鏡下、座骨神経の形態を観察した。

5 手術1か月後ですでに、座骨神経の形態及び機能の回復が認められ、再生した神経の状態も、正常状態により近かった。

比較例1

内腔にコラーゲン線維束を挿入しなかった以外は、実施例1記載の方法で、コラーゲン被覆層を有するポリグリコール酸のメッシュ状チューブを作成し、熱脱水架橋処理に付し、マトリックスゲルを充填した。

ネコ（体重5kg）の座骨神経25mmを切除し、両側の神経断端を上記で調製したチューブに内挿し、10-0ナイロン糸で結紮して連結した。

15 術後、1、2、3又は4か月後に、H R P染色によって軸索輸送を、大脳体性感覚誘発電位及び誘発筋電図によって生理学的機能を観察した。ネコを犠牲死させ、肉眼及び光学顕微鏡下、座骨神経の形態を観察した。その結果、座骨神経の形態及び機能の回復が認められたのは、2か月後であった。

実施例2

ブタ皮膚由来の酵素可溶化コラーゲンを約1重量%含む1N塩酸溶液に、長さ約10cm、直径約4～5mmのテフロン棒を浸漬し、引き上げることによって、テフロン棒の表面に厚さ約10mmのコラーゲン塩酸溶液層を形成し、これを約0℃で約12時間凍結した。

これを更に真空下、約0℃で約24時間凍結乾燥して、コラーゲン塩酸溶液層を微細線維化コラーゲン層とした。表面に微細線維化コラーゲン層が形成されたテフロン棒を、圧縮器によって、微細線維化コラーゲン層の厚さが約1mmとなるまで微細線維化コラーゲン層を圧縮した。次に、圧縮した微細線維化コラーゲン層をテフロン棒から取り外し、この微細線維化コラーゲン層からなるチューブを、再び先の約1重量%のコラーゲン塩酸溶液に浸して、微細線維化コラーゲン層の内外面上にコラーゲン塩酸溶液層を形成し、風乾する（このコラーゲン塩酸溶液への浸漬と風乾を20回繰り返した）ことによって、微細線維化コラーゲン層の内外面上にコラーゲン膜を形成させた。このようにして、微細線維化コラーゲン層からなるチューブであって、その外面及び内面にコラーゲンからなる被覆層を有するチューブを作成した。

IV型コラーゲン1g、ラミニン2g、ヘパラン硫酸プロテオグリカン0.2g、エンタクティン0.4g、EGF 2ng、 β -FGF 0.5ng、NGF 1ng、PDGF 3pg、IGF-1 2ng、及びTGF- β 1ngを生理食塩水2mlに溶解することによって、上記の成分を含むマトリックスゲルを調製した。ブタ皮膚由来酵素可溶化コラーゲン線維（ ϕ : 20μm）を、本マトリックスゲルに浸漬することによって、その線維表面を被覆し、この線維約2000本を、上記で得られたチューブに挿入し、更に真空下、150℃で24時間の熱脱水架橋処理に付した。更に、チューブとコラーゲン線維の間隙に、上記マトリックスゲルを充填して本発明の人工神経管を得た。

ネコ（体重 5 kg）の座骨神経 25 mm を切除し、両側の神経断端を上記人工神経管に内挿し、10-0 ナイロン糸で結紮して連結した。

術後、1、2、3 又は 4 か月後に、HRP 染色によって軸索輸送を、大脳体性感覚誘発電位及び誘発筋電図によって生理学的機能を観察した。ネコを犠牲死させ、肉眼及び光学顕微鏡下、座骨神経の形態を観察した。

手術 1 か月後すでに、座骨神経の形態及び機能の回復が認められ、再生した神経の状態も、正常状態により近かった。

10 比較例 2

内腔にコラーゲン線維束を挿入しなかった以外は、実施例 2 記載の方法で、微細線維化コラーゲンからなるチューブであって、その外面及び内面にコラーゲンからなる被覆層を有するチューブを作成し、熱架橋処理に付し、マトリックスゲルを充填した。

15 ネコ（体重 5 kg）の座骨神経 25 mm を切除し、両側の神経断端を上記人工神経管に内挿し、10-0 ナイロン糸で結紮して連結した。

術後、1、2、3 又は 4 か月後に、HRP 染色によって軸索輸送を、大脳体性感覚誘発電位及び誘発筋電図によって生理学的機能を観察した。ネコを犠牲死させ、肉眼及び光学顕微鏡下、座骨神経の形態を観察した。その結果、座骨神経の形態及び機能の回復が認められたのは、2 か月後であった。

比較例 3

コラーゲン線維束を挿入せず、またマトリックスゲルも充填しな

かった以外は、実施例 1 記載の方法で、コラーゲン被覆層を有する
ポリグリコール酸のメッシュ状チューブを作成し、熱架橋処理に付
した。ネコ（体重 5 kg）の座骨神経 25 mm を切除し、両側の神経
断端を上記人工神経管に内挿し、10-0 ナイロン糸で結紮して連
5 結した。

術後、1、2、3 又は 4 か月後に、HRP 染色によって軸索輸送
を、大脳体性感覚誘発電位及び誘発筋電図によって生理学的機能を
観察した。ネコを犠牲死させ、肉眼及び光学顕微鏡下、座骨神経の
形態を観察した。

10 神経が再生したのは、手術 2 か月後であり、3 か月後には、軸索
輸送及び電気生理学的機能も回復した。

比較例 4

20 重量 % ゼラチン水溶液より外径 1.0 ~ 1.5 mm のチュ
ーブを、自然乾燥法により作成し、150 °C で 24 時間、熱脱水架橋
15 処理に付した。

ラットの座骨神経 10 mm を切除し、両側の神経断端を上記人工
神経管に内挿し、10-0 ナイロン糸で結紮して連結した。

術後、1、2、3 又は 4 か月後に、HRP 染色によって軸索輸送
を、大脳体性感覚誘発電位及び誘発筋電図によって生理学的機能を
観察した。ラットを犠牲死させ、肉眼及び光学顕微鏡下、座骨神経
20 の形態を観察した。

1 か月後には、太い神経幹が再生して、1.0 ~ 1.5 mm の欠
損部が連結していた。2 か月後には、軸索輸送、生理学的機能とも
回復が認められた。

産業上の利用可能性

本発明の人工神経管は、神経が再生し終るまでの間、その形状を維持することができ、また神経の再生を誘導、促進するため、従来の人工神経管と比較して、切斷された神経は、より速やかにより長く再生し、再生した神経の状態もより正常に近く、神経機能の回復も良好である。また損傷を受けた脊髄の再生、回復のための人工脊髓管としても使用することができる。

請 求 の 範 囲

1. 生体内分解吸収性材料からなるチューブの内面及び外面にゼラチン又はコラーゲンからなる被覆層を有するチューブと、その内腔に、該チューブの軸線にほぼ平行に該チューブを貫通する空隙を有するコラーゲン体からなり、更に該空隙が、コラーゲン、ラミニン、ヘパラン硫酸プロテオグリカン、エンタクティン及び成長因子を含むマトリックスゲルで充填されている人工神経管。
5
2. チューブが架橋処理されており、その内腔のコラーゲン体が、該チューブの軸線にほぼ平行に挿入された架橋処理されたコラーゲン線維束であり、該コラーゲン線維間の空隙及び該コラーゲン線維と該チューブとの間の空隙が、コラーゲン、ラミニン、ヘパラン硫酸プロテオグリカン、エンタクティン及び成長因子を含むマトリックスゲルで充填されている、請求の範囲第1項記載の人工神経管。
10
3. チューブが架橋処理されており、その内腔のコラーゲン体が、該チューブの軸線にほぼ平行にチューブを貫通する孔である空隙を有する架橋処理されたコラーゲンゲルであり、該空隙がコラーゲン、ラミニン、ヘパラン硫酸プロテオグリカン、エンタクティン及び成長因子を含むマトリックスゲルで充填されている、請求の範囲
15 第1項記載の人工神経管。
4. 生体内分解吸収性材料が、ポリグリコール酸、ポリ乳酸、グリコール酸と乳酸との共重合体、乳酸と ϵ -カプロラクトンとの共重合体、ポリジオキサン、及びグリコール酸とトリメチレンカーボネートとの共重合体の群から選択される材料からなるメッシュ状材
20

料である、請求の範囲第1項記載の人工神経管。

5. 生体内分解吸収性材料であるメッシュ状材料が、約10～300μmのメッシュ孔径を有する、請求の範囲第4項記載の人工神経管。

5. 生体内分解吸収性材料が、微細線維化コラーゲンからなり、そしてチューブの被覆層が、コラーゲンからなる、請求の範囲第1項記載の人工神経管。

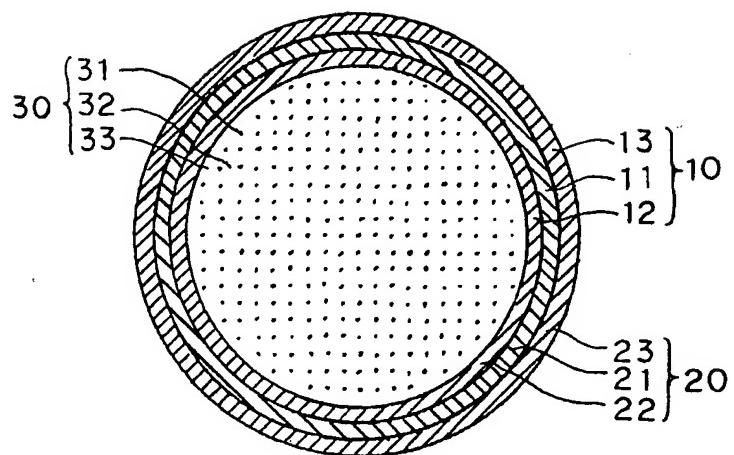
7. コラーゲン線維束のそれぞれの線維が、コラーゲン、ラミニン、ヘパラン硫酸プロテオグリカン、エンタクティン及び成長因子を含むマトリックスゲルで被覆されている、請求の範囲第2項記載の人工神経管。

8. 請求の範囲第2項記載の人工神経管の製造方法であって、生体内分解吸収性材料からなるチューブの内面及び外面にゼラチン又はコラーゲンからなる被覆層を有するチューブを作成し；該チューブの軸線にほぼ平行にコラーゲン線維束を挿入し；架橋処理に付し；そして該チューブ内の該コラーゲン線維間の空隙及び該コラーゲン線維と該チューブとの間の空隙に、コラーゲン、ラミニン、ヘパラン硫酸プロテオグリカン、エンタクティン及び成長因子を含むマトリックスゲルを充填する方法。

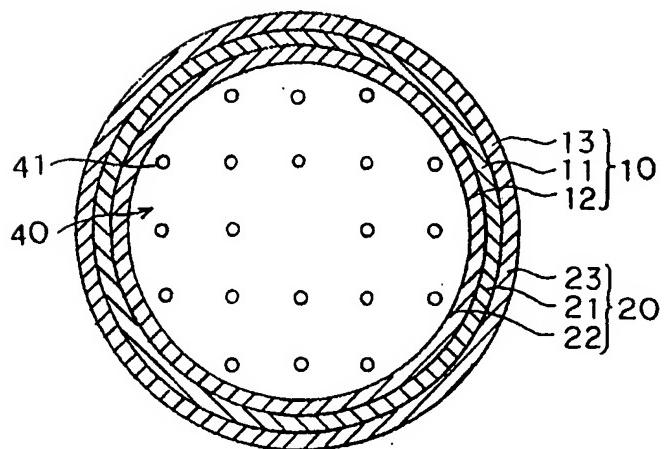
9. 請求の範囲第3項記載の人工神経管の製造方法であって、生体内分解吸収性材料からなるチューブの内面及び外面にゼラチン又はコラーゲンからなる被覆層を有するチューブを作成し；該チューブの軸線にほぼ平行に棒状の芯材を挿入し；該チューブにコラーゲン溶液を充填し；架橋処理に付し；芯材を除去して、該チューブを貫

通する孔である空隙を形成させたコラーゲンゲルをその内腔に有するチューブを得；そして該空隙にコラーゲン、ラミニン、ヘパラン硫酸プロテオグリカン、エンタクティン及び成長因子を含むマトリックスゲルを充填する方法。

第 1 図



第 2 図



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP97/04203

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
Int.Cl⁶ A61L27/00, A61F2/04

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁶ A61L27/00, A61F2/04

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP, 62-144663, A (Allied Corp.), June 27, 1987 (27. 06. 87) (Family: none)	1 - 9
A	JP, 7-505327, T2 (Meadox Medicals Inc.), June 15, 1995 (15. 06. 95) & WO, 94/06373, A & US, 5383925, A	1 - 9

 Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

"A"	Special categories of cited documents: document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"T"	later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"E"	earlier document but published on or after the international filing date	"X"	document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"L"	document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y"	document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"O"	document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&"	document member of the same patent family
"P"	document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		

Date of the actual completion of the international search January 20, 1998 (20. 01. 98)	Date of mailing of the international search report January 27, 1998 (27. 01. 98)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

A. 発明の属する分野の分類(国際特許分類(IPC))

Int. C16 A61L27/00, A61F2/04

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料(国際特許分類(IPC))

Int. C16 A61L27/00, A61F2/04

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース(データベースの名称、調査に使用した用語)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	JP, 62-144663, A (アライド・コーポレーション)、27. 6月. 19 87 (27. 06. 87) (ファミリーなし)	1-9
A	JP, 7-505327, T2 (ミードツクス メディカルズ インコーポレイテッド))、15. 6月. 1995 (15. 06. 95) &WO, 94/06373, A&U S, 5383925, A	1-9

 C欄の続きにも文献が列挙されている。 パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

- 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
 「E」先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの
 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献(理由を付す)
 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

- 「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
 「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日 20. 01. 98	国際調査報告の発送日 27.01.1998
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 郵便番号100 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官(権限のある職員) 佐野 整博 電話番号 03-3581-1101 内線 3452 印 4C 7019

様式PCT/ISA/210(第2ページ)(1992年7月)